

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

KARINA GABRIELLE RESGES ORIVES

**EFEITOS DO DESOXINIVALENOL SOBRE O PLEXO MIOENTÉRICO
DE RATOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS - PR
2018

KARINA GABRIELLE RESGES ORIVES

**EFEITOS DO DESOXINIVALENOL SOBRE O PLEXO MIOENTÉRICO
DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial para aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa

DOIS VIZINHOS - PR
2018



TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso nº__

EFEITOS DO DESOXINIVALENOL SOBRE O PLEXO MIOENTÉRICO DE RATOS

por

KARINA GABRIELLE RESGES ORIVES

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às **17** horas do **dia 23 de novembro de 2018**, como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo (Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos). O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho **APROVADO**.

Dra. Nédia de Castilhos Ghisi
Professora UTFPR-DV

Dr. Fernando Carlos de Sousa
Orientador
Professor UTFPR-DV

Dra. Patrícia Franchi de Freitas
Professora UTFPR-DV

Dra. Marciele Felippi
Coordenadora do Curso de Ciências
Biológicas
UTFPR – Dois Vizinhos

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

RESUMO

ORIVES, Karina Gabrielle Resges. **Efeitos do desoxinivalenol sobre o plexo mioentérico de ratos.** 2017. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Dois Vizinhos, 2018.

O desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida principalmente por fungos da espécie *Fusarium graminearum* e ocorre como contaminante de grãos em diversas partes do mundo. Grande interesse econômico e científico tem sido dado ao estudo do DON devido ao fato dessa toxina ocorrer com alta frequência em colheitas que formam a base alimentar para animais de produção e para populações humanas. Até o presente momento nenhum estudo avaliou diretamente os efeitos do DON sobre o sistema nervoso entérico. O sistema nervoso entérico é a porção do sistema nervoso responsável pela inervação intrínseca do trato gastrointestinal. Objetivando-se avaliar os efeitos da alimentação com dieta contaminada com doses crescentes de DON sobre os neurônios do plexo mioentérico de ratos em crescimento. Para isso foram utilizados 50 ratos Wistar machos com 21 dias de vida, os quais foram alimentados por 42 dias com dietas experimentais com níveis de DON de 0, 0,2, 0,75, 1,75 e 2,0 mg/kg. Após o período experimental foi coletado o íleo de seis animais por tratamento experimental e foi realizada a evidência neuronal com uso azul de metileno. A adição de DON nas dietas experimentais não alterou a organização morfológica do plexo mioentérico. Os resultados indicam que o DON afeta o plexo mioentérico causando redução no crescimento dos neurônios nos animais alimentados com doses de 0,75, 1,75 e 2,0 mg/kg e redução na densidade de neurônios mioentéricos em alta síntese de proteínas na dose de 0,2 mg/kg. Postula-se que esses efeitos se devem às ações de inibição da síntese proteica e efeito pró-apoptótico dessa micotoxina.

Palavras chave: Sistema nervoso entérico. Micotoxinas. Grãos contaminados.

ABSTRACT

ORIVES, Karina Gabrielle Resges. **Effects of deoxynivalenol on the myenteric plexus of rats.** 2017. 46f. Completion Work Course (Undergraduate Degree in Biological Sciences), Federal University of Paraná Technology - Paraná - Dois Vizinhos, 2018.

Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin produced mainly by the fungus specie *Fusarium graminearum* and that occurs worldwide as a grain contaminant. A wide economic and scientific interest has been given to DON research because this toxin occurs commonly as a contaminant of crops that are used as raw materials to produce foods and feedstuffs. No study has already assessed the effects of DON on the enteric nervous system. The enteric nervous system is the portion of the nervous system responsible by the intrinsic innervation of the gastrointestinal tract. This study aimed to assess the effects of a diet contaminated with increasing doses of DON on the myenteric neurons of growing rats. Fifty male Wistar rats with 21 days of life were used; the animals were fed for 42 days with experimental diets containing DON at levels of 0, 0.2, 0.75, 1.75 and 2.0 mg/kg. After the experimental period it was collected the ileum of six rats per experimental group and the myenteric neurons were stained with metilene blue. The addition of DON in the experimental diets did not change the morphological organization of the myenteric plexus. It was observed that the presence of DON in the diet at levels of 0.75, 1.75 and 2.0 mg/kg impaired the neuronal growth and at 0.2 mg/kg it caused the reduction in the density of the myenteric neurons in high protein synthesis activity. It is postulated the effects of the micotoxin are due to its protein synthesis inhibition and pro-apoptotic effects.

Keywords: Enteric nervous system. Mycotoxins. Contaminated grains.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	14
3.2 DIETAS EXPERIMENTAIS.....	17
3.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETAS DE TECIDOS.....	17
3.3.1 Coleta e processamento do íleo.....	17
3.4 ESTUDO DO PLEXO MIOENTÉRICO.....	18
3.4.1 Obtenção dos preparados totais de membrana.....	18
3.4.2 Evidenciação neuronal.....	18
3.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E QUANTITATIVA NEURONAL.....	20
3.5.1 Análise Morfométrica.....	20
3.5.2 Análise Quantitativa.....	20
3.5.3 Análise Estatística.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 DADOS CORPORAIS.....	22
4.2 ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	23
4.3 MORFOMETRIA NEURONAL.....	24
4.4 QUANTIFICAÇÃO NEURONAL.....	29
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXO	46

1 INTRODUÇÃO

Os cereais são alimentos consumidos em abundância em todo o mundo, apresentam valores nutricionais relevantes e formam a base da alimentação de seres humanos e de animais de produção (STREIT et al., 2013). Diversas espécies de fungos ocorrem como contaminantes naturais de grãos no campo e no armazenamento. Por esse motivo, para a produção alimentos e rações deve-se manter a atenção necessária desde a produção, armazenamento e processamento desses grãos (VIEIRA, 2006). Entre os fungos que contaminam grãos, destacam-se os do gênero *Fusarium* sp., por ocorrerem em diversas partes do mundo e por algumas espécies produzirem diversos tipos de micotoxinas (CALORI-DOMINGUES et al., 2007). Micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que apresentam efeitos tóxicos no ser humano e em animais, estes efeitos dependem das doses ingeridas (GONÇALEZ; PINTO; FELICIO, 2001), podendo ser até mesmo letais em casos mais graves (PEREIRA, 2008).

Produtos alimentícios, principalmente quando produzidos a partir de grãos, podem apresentar níveis elevados de contaminação com micotoxinas, o que causa preocupação na comunidade científica e nos gestores de sistemas de saúde (SOBROVA et al., 2010). Diversos estudos têm demonstrado que micotoxinas, mesmo quando presentes em baixas doses, podem acarretar problemas na saúde humana e animal (MOLIN; VALENTINI, 1999; BENNETT; KLICH, 2003). Levando-se em consideração a necessidade de estabelecer limites máximos a serem seguidos pelas indústrias visando o controle das quantidades de micotoxinas presentes em grãos e nos produtos derivados destes grãos, a partir de 2011 o Brasil passou a contar com legislação para diversas micotoxinas (LAMARDO, 2004). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) instituiu a Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 que determina limites máximos tolerados para micotoxinas em grãos e alimentos produzidos no Brasil. Essa legislação visa que entre 2011 e 2016 ocorra uma redução progressiva dos níveis de diversas micotoxinas em grãos, alimentos e rações para níveis compatíveis com o preconizado por órgãos internacionais como, por exemplo, o Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos e a Comissão Europeia (EU) na União Europeia, que estabelecem limites para micotoxinas que devem ser seguidos rigorosamente para que ocorra a exportação desses grãos (ANVISA, 2011).

Os tricotecenos formam um grupo significativo de micotoxinas encontrados com frequência em alimentos e rações. O tricoteceno mais comumente encontrado como contaminante de produtos destinados à alimentação humana e animal é o desoxinivalenol (DON). O DON é produzido principalmente pelo fungo *Fusarium graminearum* durante a contaminação de colheitas de trigo. Sabe-se que o mecanismo de toxicidade dos tricotecenos, incluindo o DON, está relacionado ao seu efeito sobre a síntese proteica por atuar como inibidor da enzima peptidil transferase nos ribossomos eucariotos (MARESCA et al., 2002). Os efeitos desencadeados pela contaminação com DON dependem da quantidade ingerida e tempo de exposição à toxina. Alguns sintomas já observados são náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, tontura e febre (LAMARDO, 2004).

Em relação ao trato gastrointestinal (TGI) Bouhet e Oswald (2007) constataram que, ao entrar em contato com o intestino, o DON pode afetar de maneira direta o funcionamento deste órgão, interferindo na absorção de nutrientes necessários para seu funcionamento e no metabolismo do organismo de animais e humanos. Além disso, as paredes dos órgãos que formam o TGI alojam milhares de neurônios que juntamente com as células da glia entérica constituem o sistema nervoso entérico (SNE). O SNE é organizado em dois grandes plexos ganglionados, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (SOUSA; MIRANDA-NETO, 2009), que recebem estes nomes devido a sua localização no TGI (COSTA et al., 2000; GERSHON, 2000). O SNE é também o responsável pela inervação intrínseca do TGI, representa o principal mecanismo neural de controle dos processos de motilidade, secreção, digestão e absorção de nutrientes (SOUSA, 2013).

Alguns trabalhos já estudaram os efeitos do DON sobre sistema nervoso, demonstrando que essa micotoxina possui efeitos neurotóxicos (BONNET et al., 2012). Entretanto nenhum trabalho publicado até o momento avaliou os efeitos desta micotoxina no SNE. Neste contexto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos da alimentação com dieta contaminada com doses crescentes de DON sobre os neurônios do plexo mioentérico de ratos em crescimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Reino Fungi detém organismos com uma vasta diversidade de modos de vida, tolerando variados habitats onde podem ser encontrados, dentre estes

ambientes podemos citar o solo, a água, os vegetais, os animais, o homem e em detritos em geral (TORTORA; CASE; FUNKE, 2012). Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, obtendo sua alimentação a base de matéria orgânica inanimada ou nutrindo-se como parasitas de hospedeiros vivos. Fungos são de grande importância agrícola, ecológica e biotecnológica, pois mantêm o equilíbrio do ambiente decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, como outros microrganismos patogênicos e também são amplamente utilizados na indústria, por exemplo, em processos fermentativos (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015; OLIVEIRA, 2010).

Apesar disso, sabe-se que alguns gêneros de fungos amplamente distribuídos no planeta como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., apresentam espécies capazes de produzir toxinas, denominadas genericamente de micotoxinas quando afetam os seres humanos e animais de produção. As micotoxinas são metabólitos secundários que necessitam de condições ambientais favoráveis, como temperatura e umidade para sua produção (MORGAVI; RILEY, 2007). As micotoxinas podem causar diversos efeitos negativos em seres humanos e animais, inclusive podem levar à morte (LAZZARI, 1997). No caso de seres humanos e animais de produção o contato com esses metabólitos secundários geralmente ocorre pela ingestão de alimentos contaminados (BENNETT; KLICH, 2003).

Segundo Miller (2008) em condições experimentais, a alimentação de animais com rações contendo micotoxinas, mesmo em baixas doses, aumenta a suscetibilidade a doenças causadas por bactérias, fungos ou vírus. Ainda este autor afirma que a ingestão de micotoxinas gera importantes implicações também para a saúde humana. Adicionalmente, as micotoxinas ingeridas após metabolizadas podem dar origem a subprodutos tóxicos que podem ser excretados no leite, carne e ovos, e dessa forma entrar na cadeia alimentar humana se tornando uma fonte de contaminação indireta (MOLIN; VALENTINI, 1999; BENNETT; KLICH, 2003).

O crescimento de fungos em matérias primas da cadeia produtora de alimentos e sua contaminação por micotoxinas geralmente ocorre em campo, com a contaminação das plantas produtoras destas matérias primas e este processo pode se estender durante o armazenamento dos grãos. Além disso, algumas micotoxinas não são capazes de serem eliminadas inteiramente após colheita e moagem dos

grãos, permanecendo nos produtos até mesmo posteriormente a conversão para alimentos (CREPPY, 2000). Atualmente a contaminação de grãos como milho e trigo por fungos micotoxicogênicos, é um problema em diversas partes do mundo (PETSKA, 2010). Diante disso, tem-se constituído um problema de saúde pública, considerando que esses grãos são amplamente utilizados como base da alimentação dos seres humanos e produção de alimentos para animais (STREIT et al., 2013).

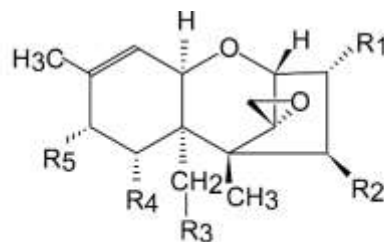
Segundo Lazzari (1997) micotoxinas tendem a atuar afetando diretamente na renda dos produtores, reduzem o rendimento dos animais o que conseqüentemente faz com que a exportação de produtos como grãos e derivados se torne mais cara, além de elevar o custeio da saúde pública em decorrência do consumo de produtos com micotoxinas e o aumento de doenças que afetam a saúde humana. Alimentos contaminados podem causar micotoxicoses cujos efeitos vão depender de alguns fatores como, por exemplo, o tempo de exposição às micotoxinas, idade e estado nutricional em que o indivíduo se encontra (PERAICA et al., 2000; BHATNAGAR; YU; EHRLICH, 2002). De acordo com a Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO), aproximadamente 25% do suprimento mundial de grãos encontra-se contaminado com micotoxinas (DEVEGOWDA; MURTHY, 2005).

Existem legislações onde se estipula um limite acerca da presença de micotoxinas, sendo as mais relevantes as aflatoxinas (AFs), a ocratoxina A (OTA), a patulina (PAT), as fumonisinas (FUM), a zearalenona (ZEA) e o desoxinivalenol (DON). Nos países subdesenvolvidos, a exposição à micotoxinas ocorre com mais facilidade visto que as práticas agrícolas, os métodos de armazenamento e a legislação são inadequados (WILD; GONG, 2010). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011) para o Brasil adotaram a Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 onde fica explícito que alimentos devem respeitar limites máximos quanto as micotoxinas. A legislação estabelece tais limites para 14 categorias de alimento, dentre eles: leite e produtos lácteos, sucos de maçã e uva, café torrado (moído ou em grão) e solúvel, entre outros. Afirmando que se esses produtos permanecerem dentro dos limites estabelecidos pela regulamentação da ANVISA, não oferecem riscos para a saúde, sendo considerados seguros. Entretanto o ideal é que os alimentos apresentem a menor quantidade possível de micotoxinas, sendo dever também do produtor aplicar as melhores práticas e tecnologias, a fim de diminuir e conseqüentemente evitar que algum alimento que

esteja contaminado seja comercializado ou consumido. Porém sabe-se que é difícil controlar esses limites de uma maneira cem por cento eficaz, então a legislação impõe essas margens de segurança para o consumo dessas substâncias. Portanto, a inadimplência perante a Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 é uma punição em forma de multas de valores elevados, sendo considerada infração sanitária.

Um relevante grupo de micotoxinas são os tricotecenos (Figura 01) que possuem esse nome devido a sua estrutura química, composta de um grupamento epóxido nas posições 12 e 13 da estrutura, sendo estes originados a partir de fungos dos gêneros *Fusarium* sp., *Myrothecium* sp., *Cephalosporium* sp., *Verticimonosporium* sp., *Stachybotrys* sp. e *Trichothecium* sp. (UENO, 1983). Para os tricotecenos o anel epóxido, presente na sua estrutura é o principal componente para sua toxicidade, e a perda deste composto pode fazer com que essas micotoxinas percam suas propriedades tóxicas (MAROCHI, 1988; SNYDER, 1986; UENO, 1980). Apesar de tricotecenos estarem em abundância na natureza, uma fração ínfima de aproximadamente 10 substâncias que integram os tricotecenos do tipo A e os tricotecenos do tipo B, vem sendo encontrados na contaminação de alimentos, os mais facilmente encontrados são o desoxinivalenol (DON) e o nivalenol (NIV), já os mais tóxicos são toxina T-2 (T2) e o diacetoxiscirpenol (DAS) (RADOVÁ; HOLADOVÁ; HAJLLOVÁ, 1998).

Figura 1. Estrutura química dos tricotecenos e seus análogos.



Trichothecene	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Type A					
T-2 toxin	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Diacetoxyscirpenol	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	H
Type B					
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH	=O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	=O

Fonte: SANTOS, et al., 2010, p. 36 (Adaptado)

O mecanismo básico de toxicidade de todos os tricotecenos envolve sua capacidade de ligação à subunidade 60S do ribossomo eucariótico e sua capacidade de inibição da síntese de proteínas, devido à ligação com a enzima peptidil transferase (FEINBERG; MCLAUGHLIN, 1989), podendo desta forma, interferir tanto no alongamento quanto no final da síntese de proteínas (EHLICH; DAIGE, 1985). Através da inibição dessa enzima proteínas quinases são ativadas por mitógenos, ou seja, substâncias que ativam a proliferação celular dando início a mitose, sendo responsáveis pela transferência de sinais intracelulares, gerando posteriormente respostas a diferentes estímulos, como, por exemplo, estresse e fatores que influenciam no crescimento (CHEN et al, 2001; THOMAS; HUGANIR, 2004). Podendo expressar também efeitos secundários na síntese de DNA e RNA e efeitos prejudiciais para as mitocôndrias (CHAROENPORNSOOK; FITZPATRICK; SMITH, 1998; MEKHANCHA-DAHEL; LAFARGE-FRAYSSINET; FRAYSSINET, 1990; MINERVINI; FORNELLI; FLYNN, 2004; UENO, 1985).

O DON é um tricoteceno produzido por diversas espécies de fungos, com destaque para *Fusarium graminearum*, sendo uma das micotoxinas mais comumente encontrados em alimentos (VILLAR; CARSON, 2004). Ocorre em diversas partes do mundo como contaminante de colheitas de trigo e milho, podendo também ser identificado em rações de animais (PERAICA et al., 2000). A produção de DON depende de certos fatores que garantam a permanência dessa toxina, como baixas temperaturas e altas umidades. O DON permanece intacto em grãos, mesmo quando armazenados por anos a temperatura ambiente e também resiste ao processamento destes grãos para o preparo e armazenamento de alimentos. A contaminação de produtos alimentícios com DON tem gerado preocupações crescentes (SOBROVA et al., 2010). Existem comprovações que micotoxinas como o DON, acarretam problemas de saúde para animais e humanos (FAO/IAEA, 2001). Sendo que órgãos e tecidos específicos como, fígado, rins e o sistema nervoso sejam constantemente os mais afetados (SANTURIO, 2000).

Logo é importante que se tenha conhecimento, das espécies de fungos micotoxigênicos presentes tanto no campo quanto no armazenamento, além de estar atentado a legislação vigente, para que se tenha a redução da contaminação por esses produtos (GIACOMINI; MENEGAZZO, 1998). A implantação de limites máximos para a presença dessas micotoxinas tem como finalidade evitar futuras perdas econômicas por diminuem à produção animal, e consequentemente proteger

o consumidor, já que alguns produtos de origem animal estão frequentemente contaminados com micotoxinas como DON (CANADY et al., 2001). Diante disto desde 2011, com a publicação da Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 da ANVISA, o Brasil conta com legislação que limita os níveis de DON presentes em diversos alimentos como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Ano de início de limites máximos tolerados (LMT) de desoxinivalenol em alimentos no Brasil, Brasília - DF, 9 mar, 2011.

Alimento	LMT µg/kg			
	2011	2012	2014	2016
Arroz beneficiado e derivados	750			
Alimentos à base de arroz para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200			
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e cevada malteada		1750	1250	750
Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada		2000	1500	1000
Trigo e milho em grãos para posterior processamento			3000	

Fonte: BRASIL. Resolução – RDC nº 7 Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos, de 18 de Fevereiro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 9 mar. 2011. Seção 1 pp. 66-67.

Segundo a classificação da International Agency for Research on Cancer, o DON pertence ao Grupo 3, isto é, não é carcinogênica para humanos (IARC, 2002). Porém a ingestão de DON, dependendo da dose e tempo de exposição pode desencadear efeitos tóxicos como vômitos, angina necrótica, diarreia, anorexia, alterações hematológicas, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas, seguidos ou não de morte (SNYDER, 1986). Assim como os demais tricotecenos, o mecanismo básico de toxicidade do DON se relaciona com sua capacidade de intervir nos estágios iniciais e terminais de síntese proteica, além de diminuir o transporte de nutrientes o que acarreta em apoptose de células intestinais (MARESCA et al., 2002).

Com relação ao TGI, Prado (2014) comenta que se observou em estudos com animais alimentados com rações contaminadas com o DON a ocorrência de lesões orais e hemorragias. Considerando que a principal via de contaminação por micotoxinas ocorre pela dieta, Bouhet e Oswald (2007) afirmam que é no intestino delgado que as micotoxinas, como o DON, afetam diretamente, levando a alterações na absorção e utilização de nutrientes de animais e humanos. Casos de distúrbios

gastrointestinais, como vômitos e dores abdominais já foram descritos na Ásia em humanos que consumiram produtos contaminados por *Fusarium* sp., como grãos e pães confeccionados com farinha de trigo contaminados por tricotecenos, em particular o DON (BHAT et al., 1989). Embora se obtenha alguns dados com vínculo a humanos sobre a toxicidade de DON, grande parte dos estudos são ainda realizados em animais. Dentre os animais, suínos e ratos, são espécies amplamente utilizadas como modelos mais sensíveis a toxina, sendo utilizados como analogia para o intestino humano (ERIKSEN; PETTERSSON; LINDEBERG, 2003), pois encontra-se similaridades entre as espécies. Por exemplo, após algum tempo expostos ao DON em ambos ocorre uma rápida absorção principalmente pelo TGI (AZCONA-OLIVERA et al., 1995; PESTKA; AMUZIE, 2008; PRELUSKY et al., 1988).

Nos ratos, que são incapazes de vomitar, a exposição aguda ao DON está associada à indução de anorexia e citocinas pró-inflamatórias, enquanto a exposição subcrônica e crônica ao DON causa supressão de crescimento e decréscimo de peso (CANADY et al., 2001). Nos suínos, que têm uma resposta emética, o DON provoca os efeitos acima mencionados (FORSYTH et al., 1977; PESTKA et al., 1987). Nos animais ruminantes os micro-organismos estomacais podem realizar algum grau de degradação de micotoxinas antes que essas passem pelo intestino delgado e possam ser absorvidas, por isso estes animais são menos sensíveis às micotoxinas do que os monogástricos, como os seres humanos (ALTECH, 2001).

Diferentes estudos já foram feitos a fim de desvendar quais os prováveis efeitos que as micotoxinas provenientes do gênero *Fusarium* sp., têm sobre o sistema nervoso (DOMIJAN, 2012). Contudo, a maioria dos estudos já desenvolvidos tem focado os efeitos destas toxinas sobre o sistema nervoso central (SNC) (DOMIJAN; ABRAMOV, 2011). Poucos trabalhos têm abordado os efeitos de micotoxinas sobre SNE apesar de sua grande importância funcional. O SNE é a porção mais complexa do sistema nervoso periférico sendo responsável pela inervação intrínseca do TGI. Os neurônios do SNE têm origem embriológica a partir de células da crista neural, de onde se deslocam para a parede dos órgãos do TGI desde o esôfago até o ânus (FURNESS; COSTA, 1987; GABELLA, 1990).

Os neurônios presentes no SNE podem ser classificados em basicamente três tipos principais de acordo com sua morfologia e fisiologia. Os neurônios sensitivos, que funcionam de maneira a controlar a distensão da parede intestinal, os interneurônios, que repassam as informações entre os próprios neurônios

entéricos e os neurônios motores, que controlam de fato todas as atividades do TGI (FURNESS; COSTA, 1987; HANSEN, 2003). O SNE representa o principal mecanismo neural de controle da atividade motora, secretora e absorptiva gastrointestinal (SOUSA, 2013).

Neurônios do SNE, principalmente de vertebrados, tem a característica de sofrer modificações fisiológicas desde a sua origem embrionária, ou seja, da crista neural até a sua idade madura. O envelhecimento dos organismos influencia diretamente nessas modificações, de modo que a partir de certa idade alguns sistemas começam a apresentar um declive em relação ao funcionamento natural de seus órgãos. Observa-se que o mesmo acontece com os neurônios entéricos. Estes com o tempo, passam a apresentar um decréscimo neuronal e devido ao seu arranjo morfológico mais simples do que o do SNC, seu código químico complexo e a disponibilidade de diversas técnicas de estudo, o SNE tem se mostrado uma valiosa ferramenta de pesquisa sobre processos de neuroplasticidade (FURLAN; SOUZA, 2001). Alguns estudos já confirmaram a redução neuronal devido ao envelhecimento no plexo mioentérico de ratos (GABELLA, 1990), e ao se comparar ratos na fase de vida jovem e adulta observamos essa redução em até 40% em neurônios do intestino delgado (SANTER; BAKER, 1988).

Os neurônios presentes nesse sistema encontram-se organizados em dois grandes plexos ganglionados, o plexo mioentérico e o plexo submucoso. Estes plexos são formados por corpos de neurônios, fibras nervosas e por células da glia entérica (SOUSA; MIRANDA-NETO, 2009). Os plexos foram denominados de acordo com sua localização na parede dos órgãos do TGI. O plexo submucoso localiza-se entre o tecido conjuntivo da túnica submucosa e o plexo mioentérico localiza-se entre as camadas da túnica muscular externa (COSTA et al., 2000; GERSHON, 2000).

Na maioria dos estudos realizados até o momento, conseguiu-se observar que o DON é rapidamente metabolizado, não sofrendo acúmulo nos tecidos. Os efeitos tendem a durar certo intervalo de tempo, mas o suficiente para causar problemas de grau intermediário ou deletérios aos organismos que entram em contato com essa micotoxina (PESTKA, 2010). Entretanto na maioria dos estudos já apresentados, somente confirma e expõe os efeitos tóxicos desta micotoxina nos animais. Muitas questões ainda permanecem sem solução, como por exemplo, no caso de seres humanos ainda são necessários mais estudos para comprovação dos

efeitos tóxicos do DON, apesar de já serem encontrados alguns relatos na literatura de como o DON age de forma prejudicial à saúde humana. Portanto não se sabe de fato, se os efeitos que foram estabelecidos para os animais ocorrem da mesma maneira no homem e nos neurônios do plexo mioentérico de ratos em crescimento (EFSA JOURNAL, 2013).

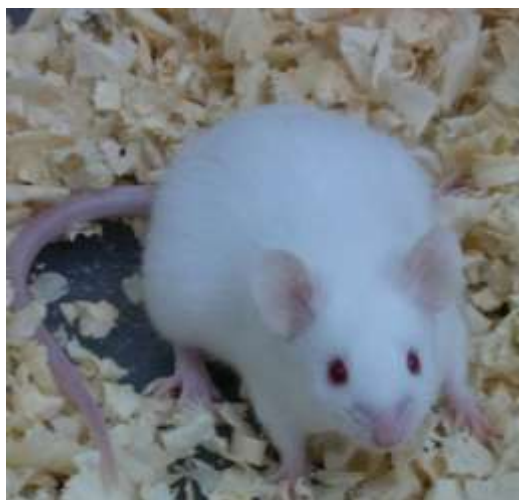
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as metodologias descritas neste estudo, incluindo a utilização e eutanásia de animais, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, conforme parecer Protocolo nº 2014-014 (Anexo).

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 50 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com 21 dias de idade e aproximadamente 50 gramas de peso corporal (Figura 2), comprados e transportados da Universidade Estadual de Maringá (UEM), os quais foram mantidos no Biotério da UTFPR-DV, sob condições controladas de luz clara e escura por 12 horas e temperatura de 22 ± 2 °C (Figura 3)

Figura 2. *Rattus norvegicus* linhagem Wistar.



Fonte: Letícia Romanna Batista D'Angelo (NUCAL - UFSJ)

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em caixas de polipropileno distintas, de acordo com os grupos experimentais, com dez animais em cada grupo experimental e com cinco animais em cada caixa.

Figura 3. Biotério – local de criação dos ratos Wistar durante período experimental de 42 dias.



Fonte: Fernando Carlos de Sousa

Os grupos experimentais foram formados de acordo com a dieta, como se segue:

GRUPO 1: Ração sem adição de desoxinivalenol (controle)

GRUPO 2: Ração com adição de 0,2 mg de desoxinivalenol/kg ração

GRUPO 3: Ração com adição de 0,75 mg de desoxinivalenol/kg ração

GRUPO 4: Ração com adição de 1,75 mg de desoxinivalenol/kg ração

GRUPO 5: Ração com adição de 2 mg de desoxinivalenol/kg ração

A ração utilizada seguiu o padrão AIN-93G de dieta purificada para roedores em fase de crescimento, com composição conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Composição da dieta base fornecidas para roedores em fase de crescimento, gestação e lactação durante o período experimental (AIN-93G).

Ingrediente	%
Milho	33,63
Farelo de soja	33,10
Farelo de trigo	27,20
Óleo de soja	2,30
Calcário calcítico	2,07
Fosfato bicálcio	0,73
Sal comum (iodado)	0,50
Premix vitamínico ¹	0,10
Premix mineral ²	0,35
BHT ³	0,02

Fonte: O Autor.

Premix vitamínico¹: suplemento vitamínico, composição por kg: ác. Fólico 200 mg; ác. nicotínico 3.000 mg; biotina 20 mg; pantotenato de cálcio 1.600 mg; piridoxina HCl 700 mg; riboflavina 600 mg; tiamina HCl 600 mg; vitamina a 4.000.000 UI; vitamina B12 2.500 mg; vitamina D3 100.000 UI; vitamina e 100.000 UI; vitamina K1 75 mg.

Premix mineral²: suplemento mineral, composição por kg: boro 14,26 mg; cálcio 142,94 g; cloro 44,9 g; cobre 72,41 mg; cromo 28,65 mg; enxofre 8,6 g; ferro 1.000 mg; flúor 28,72 mg; fósforo 56,9 g; iodo 5,95 mg; lítio 2,85 mg; magnésio 14,48 g; manganês 300 mg; molibdênio 4,32 mg; níquel 14,31 mg; potássio 102,86 g; selênio 4,28 mg; silício 143,26 mg; sódio 29,38 mg; vanádio 2,87 mg; zinco 860 mg.

BHT³: Botuil Hidroxi Tolueno.

Entre os diferentes grupos experimentais as rações se diferem apenas quanto à inclusão dos diferentes níveis de DON. O DON adicionado nas rações experimentais foi produzido pelo Laboratório de Microbiologia da UTFPR-DV (Figura 4)

Figura 4. Produção de ração contaminada com doses crescentes de DON.



Fonte: Fernando Carlos de Sousa

O período experimental foi de 42 dias, durante os quais os animais receberam ração e água fornecidos *ad libitum*. O consumo alimentar foi calculado semanalmente, pela subtração das sobras de alimento do total de alimento oferecido ao longo da semana. O peso corporal dos animais foi controlado semanalmente.

Todos os materiais de laboratórios que foram contaminados pelo DON foram detoxificados por imersão por pelo menos uma hora em solução de hipoclorito de sódio a 10% (PESTKA, AMUZIE, 2008). Todos os animais que ficaram debilitados pelo consumo de DON, ou que entraram em sofrimento por qualquer motivo foram submetidos à eutanásia.

3.2 DIETAS EXPERIMENTAIS

Para o preparo da dieta base (Tabela 2) o milho, farelo de trigo e o farelo de soja foram moídos separadamente em moinho faca com peneira de granulometria de 0,50 mm de diâmetro e misturados manualmente aos demais ingredientes. Para a produção das dietas com adição de DON, adicionam à dieta base meio de cultivo esterilizado do fungo *Fusarium graminearum* sendo novamente submetida à mistura e homogeneização. As dietas foram então peletizadas e secas em estufa de ventilação forçada (55 °C) por 24 horas. As dietas experimentais foram produzidas na fábrica de ração da UTFPR-DV.

3.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETAS DE TECIDOS

3.3.1 Coleta e processamento do íleo

Ao final do período experimental todos os ratos de todos os grupos experimentais foram pesados e submetidos à eutanásia por overdose de agente anestésico geral tiopental sódico (Thionembutal[®]) na dose de 120 mg/kg de peso corporal injetado intravenosamente.

Após a eutanásia foi realizada a laparotomia e coleta do intestino delgado para análises. O intestino delgado foi removido, pesado e mensurado. Uma amostra do íleo de seis animais de cada grupo experimental foi coletada, padronizadamente da porção proximal do órgão e utilizada para o estudo de neurônios do plexo mioentérico.

As amostras de íleo após a coleta foram imediatamente fixadas com fixador de Giemsa (Barbosa, 1978), para a preparação da solução foram utilizados os seguintes componentes: 30 mL de Formaldeído (35%), 15 mL de ácido acético

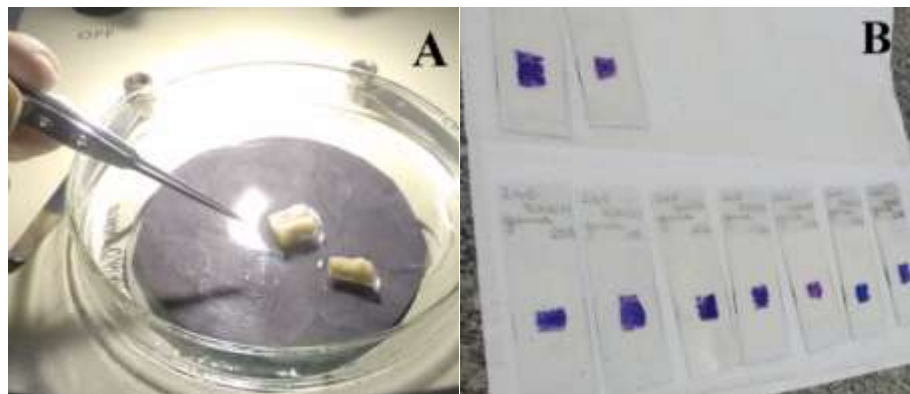
glacial, 9 g de cloreto de sódio e 1000 mL de água destilada. Para melhor fixação, cada amostra após a coleta foi lavada com solução salina, então uma das extremidades foi ligada e posteriormente foi injetado o fixador, de forma a preencher gentilmente a amostra ligando-se a outra extremidade.

3.4 ESTUDO DO PLEXO MIOENTÉRICO

3.4.1 Obtenção dos preparados totais de membrana

Após 48 horas de fixação um seguimento de cada amostra do íleo com um centímetro de comprimento foram microdissecadas e processadas para obtenção de preparados totais de membrana (Figura 5).

Figura 5. A: Segmento intestinal de aproximadamente um centímetro sendo preparado para dissecação e B: Lâminas histológicas permanentes.



Fonte: Samara Cristina Dossena

Para tanto, em cada segmento, foram removidas a túnica mucosa e a túnica submucosa, sendo preservadas a túnica serosa e túnica muscular externa, onde se encontram os neurônios mioentéricos.

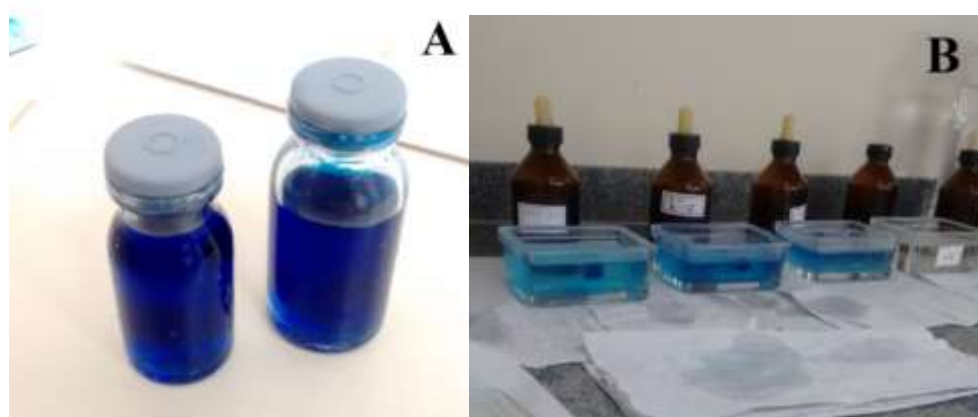
Os preparados totais foram então utilizados para evidenciação neuronal e confecção de lâminas permanentes, nas quais foram analisados os parâmetros morfológicos e quantitativos do plexo mioentérico.

3.4.2 Evidenciação neuronal

Para evidenciação neuronal os preparados totais foram corados segundo a técnica de Giemsa modificada por Barbosa (1978). A técnica histológica de Giemsa permite obtenção de preparações diafanizadas, com células ganglionares bem coradas com pouca coloração no tecido muscular. Desta forma neurônios e gânglios nervosos tornam-se evidenciados e contrastados, obtendo-se transparência da preparação e permitindo a análise do material. Em resumo, os preparados totais de membrana permaneceram fixados por entre 24 e 36 horas em solução fixadora de Giemsa.

Para corar os tecidos histológicos foram utilizados os seguintes componentes: 4 mL de solução A, contendo monofosfato ácido de potássio (9,78 g) e água destilada (1000 mL), apresentando pH em torno de 4,60; 6 mL de solução B, contendo fosfato contendo fosfato ácido de sódio (9,465 g) e água destilada (1000 mL), apresentando pH em torno de 9,23; 20 gotas de solução estoque de Giemsa contendo azul-eosina azul de metileno segundo Giemsa (1 g), glicerol (54 mL) e metanol (84 mL) e 90 mL de água destilada. Os tecidos ficaram imersos no corante preparado no período de 48 horas em temperatura ambiente (Figura 6-A).

Figura 6. A: Preparados totais imersos na solução corante e B: Processo de desidratação e diafanização das membranas histológicas.



Fonte: Samara Cristina Dossena

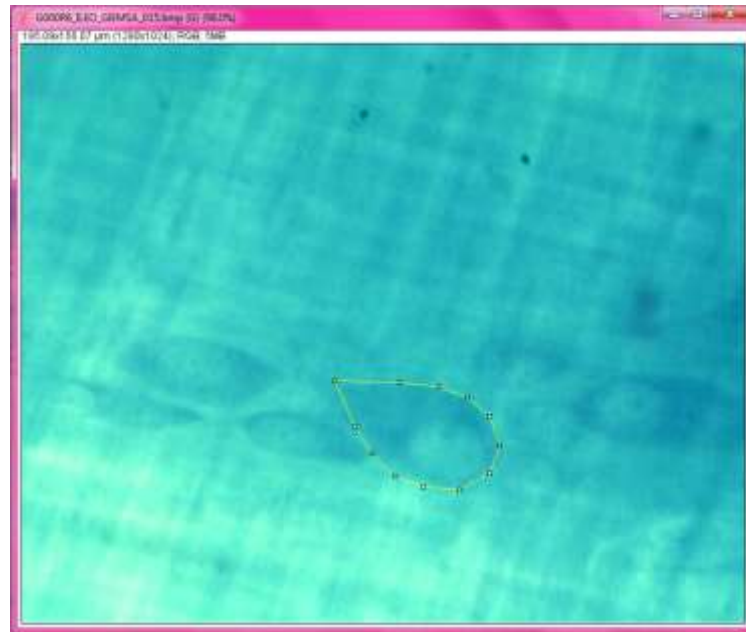
Para a confecção de lâminas permanentes, os preparados totais de membranas já corados foram desidratados, seguindo ordem crescente de álcoois entre 70% a 100% e diafanizadas através de passagem em xilol, para remoção da gordura, tornando as membranas translúcidas (Figura 6-B). Então foram montados entre lâmina e lamínula com resina sintética Permount®.

3.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E QUANTITATIVA NEURAL

3.5.1 Análise morfométrica

As lâminas permanentes foram observadas através de fotomicroscopia, utilizando-se o microscópio binocular com ampliação de 40x até 1000x - Iluminação de LED da marca Olympus, acoplado a uma câmera para captura de imagens, utilizando-se lente objetiva com aumento de 40X. Essas imagens foram importadas para o software de análise de imagem Image J, com o qual foi mensurada a área do corpo celular de 100 neurônios mioentéricos para cada animal, totalizando no final 600 neurônios por grupo experimental (Figura 7).

Figura 7. Análise de imagem pelo software mage J de neurônios mioentéricos.



Fonte: O autor.

Os resultados foram expressos em micrômetros quadrados (μm^2), e os neurônios foram distribuídos, de acordo com seu tamanho, em classes com intervalos de $50 \mu\text{m}^2$.

3.5.2 Análise Quantitativa

Para análise quantitativa, as lâminas permanentes contendo os preparados de membrana corados foram visualizadas em microscópio de luz com lente objetiva de 40 X. Foram contados os neurônios de 50 campos de microscópio por animal. Estes campos foram obtidos aleatoriamente na região mesentérica da circunferência intestinal. Para padronização das regiões da circunferência intestinal, sendo o íleo um órgão tubular, considera-se a borda de inserção do mesentério no íleo como sendo o ponto 0° e, portanto, a região mesentérica se estendendo entre 0° a 60° e 300° a 360°, a região intermediária se estendendo entre 60° a 120° e 240° a 300° e a região antimesentérica representando o intervalo entre 120° a 240° (MIRANDA-NETO et al., 2001).

Em cada campo, todos os neurônios foram contados considerando-se os neurônios que aparecerem pela metade nas margens superior e direita do campo e desprezando-se os que aparecerem pela metade nas margens esquerda e inferior a fim de evitar a dupla contagem de uma mesma célula. Os resultados de contagem neuronal foram tabelados e utilizados para expressar a relação entre o número de neurônios e o tamanho do íleo-neurônios/cm².

3.5.3 Análise Estatística

Os dados correspondentes a todas as variáveis coletadas foram submetidos a análise estatística pelo uso do software Graph Pad Prism 6®. Para comparações entre médias foi utilizado o teste de ANOVA com pós-teste de Tukey e para comparações entre distribuições de frequências foi utilizado o teste de qui quadrado. O valor de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As doses de DON de 0,2 para produtos destinados à alimentação infantil e farinha de trigo e de 0,75 mg/kg para produtos de panificação destinados ao consumo humano utilizadas neste experimento, representam os níveis máximos desta toxina atualmente aceitos pela legislação brasileira (ANVISA, 2011). Apesar destas doses de DON manter-se dentro do preconizado pela legislação é importante ressaltar que não existem dados disponíveis na literatura sobre os efeitos do DON

no SNE. Desta forma, os estudos realizados sobre os efeitos do DON sobre o plexo mioentérico de ratos podem auxiliar no estabelecimento de novos limites máximos permitidos em alimentos sem causar danos ao SNE.

Com relação aos grupos submetidos à alimentação com doses mais altas de DON (1,75 e 2,0 mg/kg de ração), representa-se os produtos que ultrapassam os limites máximos permitidos pela Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 da ANVISA, objetivando-se descobrir quais os possíveis efeitos decorrentes dessas doses de DON no plexo mioentérico. Estudos demonstram que aproximadamente 14,7% de amostras analisadas de trigo brasileiro provenientes da safra 2014/2015 apresentaram níveis acima de 3,0 mg/kg de DON em cereais. Algumas amostras continham contaminação muito além do limite máximo permitido, chegando a níveis de até 11,8 mg/kg o que mostra que esses alimentos possuem uma baixa qualidade, além de estarem contaminados com altas doses de DON (MACHADO et al, 2015).

Os ratos foram submetidos à dieta contendo DON entre os 21 e 63 dias de vida que correspondem ao final da infância, adolescência e início da vida adulta dos animais (NISTIAR et al., 2012). Este período representa uma fase crítica do desenvolvimento do sistema nervoso, tornando-o mais suscetível a lesões que podem repercutir por toda a vida do animal (SOUSA, 2013). Neste contexto foram avaliadas as alterações resultantes da ingestão do DON no arranjo morfológico, com ênfase nos aspectos quantitativos e morfométricos dos neurônios mioentéricos, relacionando as alterações observadas com seus possíveis efeitos na fisiologia do TGI.

4.1 DADOS CORPORAIS

A tabela 3 resume os parâmetros corporais dos animais ao final do período experimental.

Tabela 3. Parâmetros corporais ao final do período experimental de ratos Wistar alimentados com dieta sem adição de DON (G000) e com adição de 0,2 mg/kg (G002), 0,75 mg/kg (G075), 1,75 mg/kg (G175) ou 2,0 mg/kg (G200).

GRUPOS	G000	G002	G075	G175	G200
Ingestão alimentar média (g/100g de peso corporal/semana) ¹	54.3±2.25	50.6±2.69	54.5±3.47	56.4±3.53	55.1±3.23
Massa inicial (g) ²	54.8±3.97	54.1±2.13	53.3±2.33	52.1±2.31	53.8±2.63
Massa final (g) ³	270.3±15.20	270.2±11.07	265.3±18.62	267.0±11.52	270.5±12.61
Ganho de massa (%) ⁴	379,8±83.63	417.8±93.38	394.4±65.35	382.5±86.29	401.8±53.11

Valores expressos como média±desvio padrão. Para todas as variáveis $p>0,5$ segundo ANOVA com pos-teste de Tukey. Para 1 $n=10$ e para 2, 3 e 4 $n=6$.

Fonte: O autor.

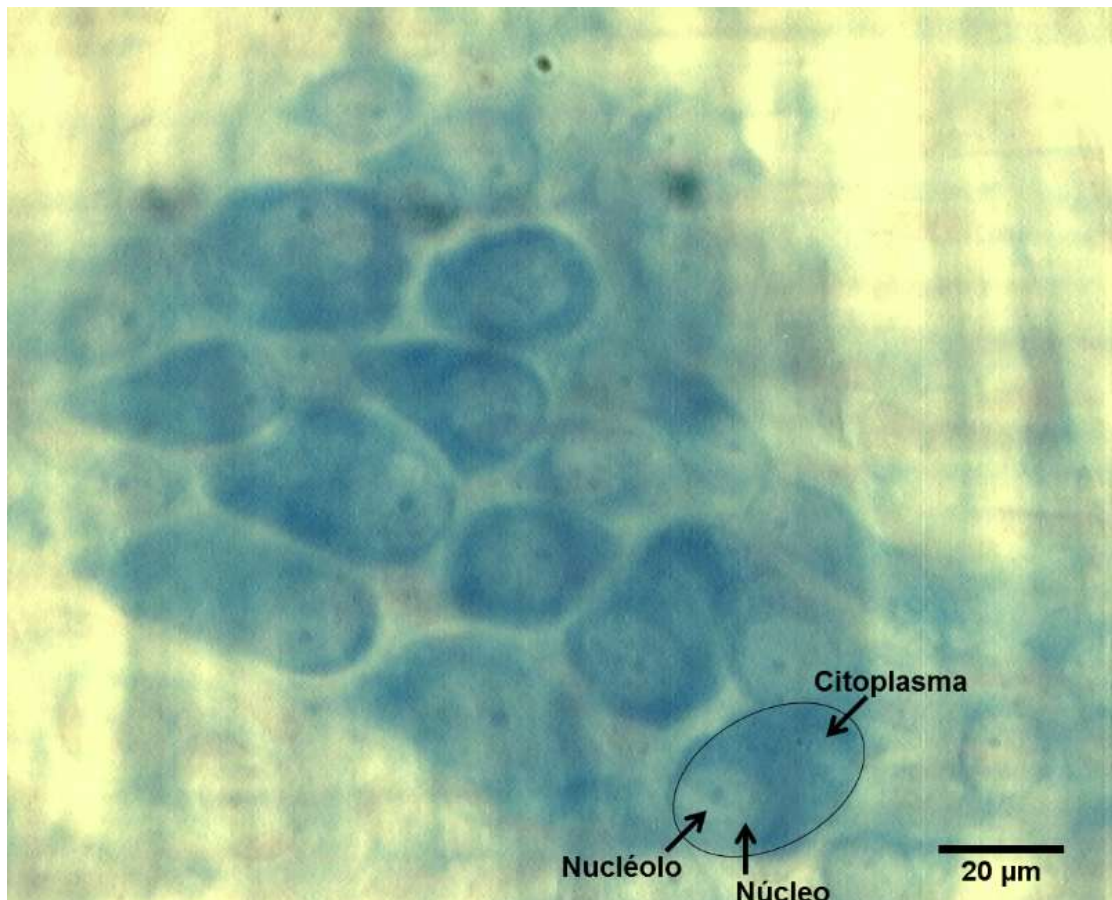
Não ocorreu a morte de animais durante o período experimental nem foram observados sinais de intoxicação aguda grave, como sintomas de problemas gastrointestinais. Ao final do período experimental os animais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao consumo alimentar, massa inicial, massa final e ganho de massa corporal.

Não existem relatos referentes às mesmas doses de DON utilizadas neste experimento, apenas doses próximas. Resultados semelhantes foram observados por Morrissey (1984), o qual expôs *Rattus norvegicus* da linhagem Sprague-Dawley com 15 dias de vida, a rações contaminadas com doses de 0,0 (controle), 0,5, 2,0 e 5,0 mg/kg, pelo período de 22 dias. Observando que não ocorreram sinais de intoxicação, nem diferença significativa em relação ao consumo alimentar comparado ao grupo controle. Porém esse autor observou que, os animais dos grupos experimentais que receberam as doses mais altas de DON, apresentaram redução na massa corporal.

4.2 ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Através da análise das lâminas permanentes contendo os preparados totais de membrana do intestino delgado, podemos observar que para ratos da linhagem Wistar, os neurônios mioentéricos foram encontrados entre as camadas da túnica muscular externa (PEREIRA, 2006; CORRÊA, 2010; MIRANDA-NETO et al, 2001; HANSEN, 2006), esse resultado também foi observado para todos os grupos experimentais, como observado na Figura 8.

Figura 8. Neurônios mioentéricos organizados em gânglios no íleo de ratos (*Rattus norvegicus*). Coloração de Giemsa segundo Barbosa (1978). Lente objetiva de 40X.



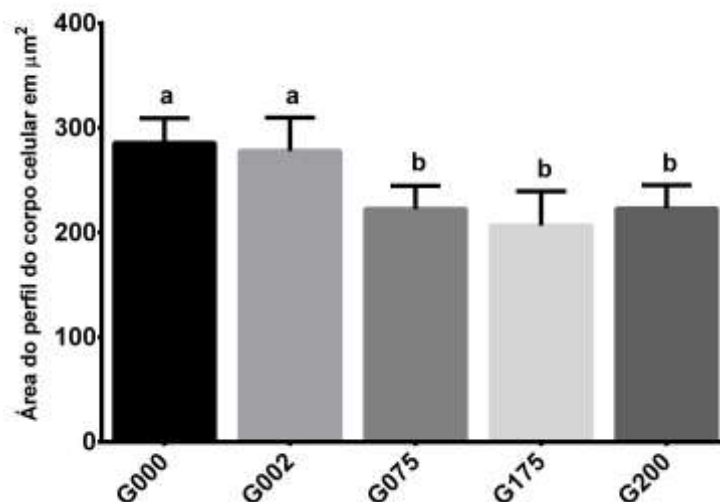
Fonte: O autor.

Durante o período experimental observamos que o consumo de dietas com DON entre os 21 e 63 dias de vida nas doses utilizadas, não alterou o arranjo morfológico do plexo mioentérico mantendo sua disposição ganglionar. Vários autores corroboram afirmando ter observado em ratos uma constituição ganglionar característica, contendo neurônios agrupados de formatos e tamanhos variados na forma de gânglios interligados (LEAMING; CAUNA, 1961; ALI; McLELLAND, 1979; GABELLA, 1971; MOLINARI et al., 1994; SOUZA; FURLAN, 2001; ZANIN et al., 2001; PEREIRA, 2006). Gabella (1987) cita que para mamíferos essa organização ganglionar tende a prevalecer, porém a forma e o tamanho das redes de gânglios podem variar entre as espécies.

4.3 MORFOMETRIA NEURON

Foi mensurada a área total do perfil do corpo celular de 100 neurônios por animal, totalizando 600 neurônios por grupo experimental. Para o grupo G000 obteve-se área média do perfil do corpo celular de $285,5 \pm 6,11 \mu\text{m}^2$, e para os grupos G002, G075, G175 e G200 obteve-se, respectivamente, $277,9 \pm 6,77 \mu\text{m}^2$; $222,4 \pm 6,25 \mu\text{m}^2$; $200,4 \pm 11,11 \mu\text{m}^2$ e $223,6 \pm 10,60 \mu\text{m}^2$ (Figura 9). Através da análise por teste de ANOVA com pós-teste de Tukey não foi observado diferença estatística significativa entre os G000 e G002 ($p > 0,05$), entretanto esses grupos diferem de maneira estatisticamente significativa dos grupos G075, G175 e G200 ($p < 0,05$).

Figura 9. Área média do perfil do corpo celular de neurônios mioentéricos do íleo de ratos Wistar, expostos a concentração de 0 (G000), 0,2 (G002); 0,75 (G075); 1,75 (G175) ou 2,0 (G200) mg de DON/kg de ração.



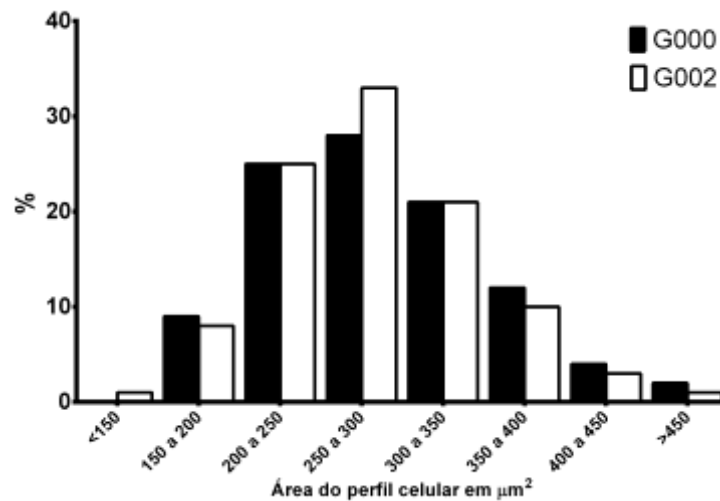
Fonte: O autor.

Os neurônios mioentéricos variam consideravelmente em tamanho e o uso de médias não permite a melhor análise de um dado tratamento sobre o tamanho neuronal. Por isso, os resultados da mensuração dos neurônios foram distribuídos em forma de frequência de classes de acordo com a área do perfil do corpo celular, adotando-se intervalos arbitrários de $50 \mu\text{m}^2$.

Estudos sobre o plexo mioentérico mostram que um mesmo indivíduo pode conter certa variabilidade de neurônios como: distribuição, tamanho e forma (IRWIN, 1931; LEAMING & CAUNA, 1961; GABELLA, 1971; GABELLA; HALASY, 1987; LLEWELLY'N-SMITH; COSTA; FURNESS, 1993; LEITE-MELO et al., 1997). Desta forma foi possível visualizar a variação no tamanho dos neurônios e avaliar as

proporções de neurônios pequenos médios e grandes e os efeitos do DON sobre os neurônios em cada categoria nos diferentes grupos experimentais. A distribuição dos neurônios foi separada em classes de acordo com intervalos de área, de forma a visualizar de maneira mais clara a distribuição de frequência. Assim, observaremos o comportamento de cada tratamento separadamente em relação ao grupo controle (G000). Os resultados dessa análise estão apresentados nas figuras 10, 11, 12 e 13.

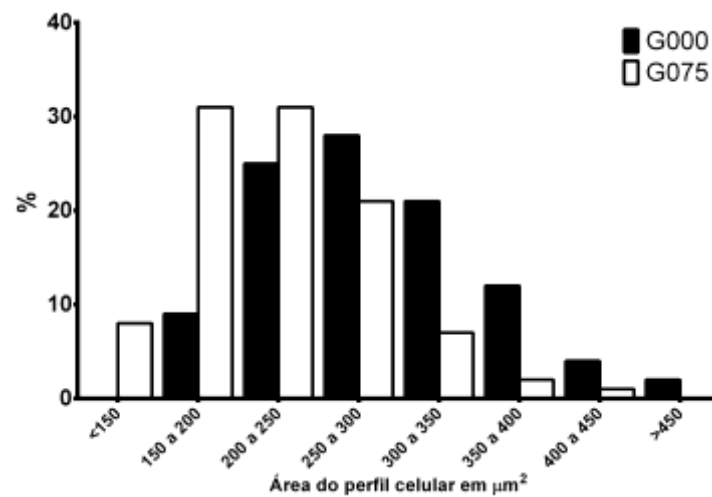
Figura 10. Histograma de distribuição de frequência em função do tamanho de neurônios mioentéricos do íleo de *Rattus norvegicus*, exposto a concentração de 0,2mg/kg (G002) de DON em relação ao grupo controle (G000). As diferenças entre as distribuições não são estatisticamente significantes ($p < 0,05$) pelo teste de qui quadrado.



Fonte: O autor.

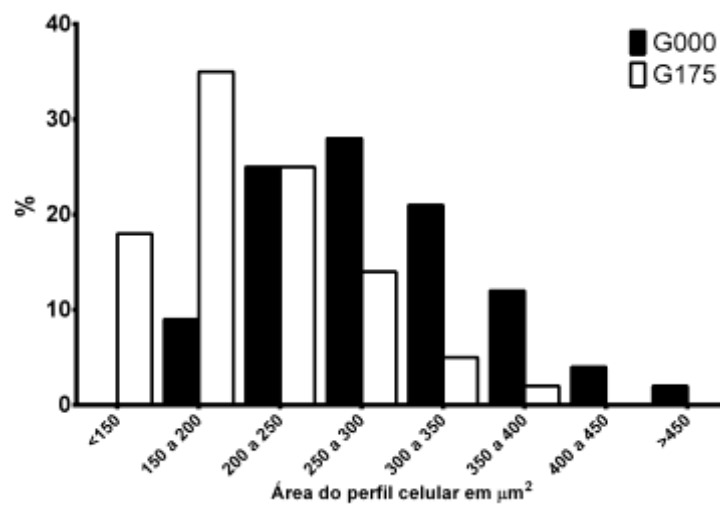
Podemos observar através da Figura 10, que os animais do grupo controle G000 se comparados ao grupo G002, que contém 0,2 mg/kg de DON, não apresentaram diferença significativa quanto ao tamanho do perfil do corpo celular, esse resultado se deu segundo teste de qui quadrado ($p > 0,05$.)

Figura 11. Histograma de frequência de distribuição em função do tamanho de neurônios mioentéricos do íleo de *Rattus norvegicus* alimentados com dieta sem adição de DON (G000) e com adição de 0,75 mg/kg (G075). As diferenças entre as distribuições são estatisticamente significantes ($p < 0,05$) pelo teste de qui quadrado.



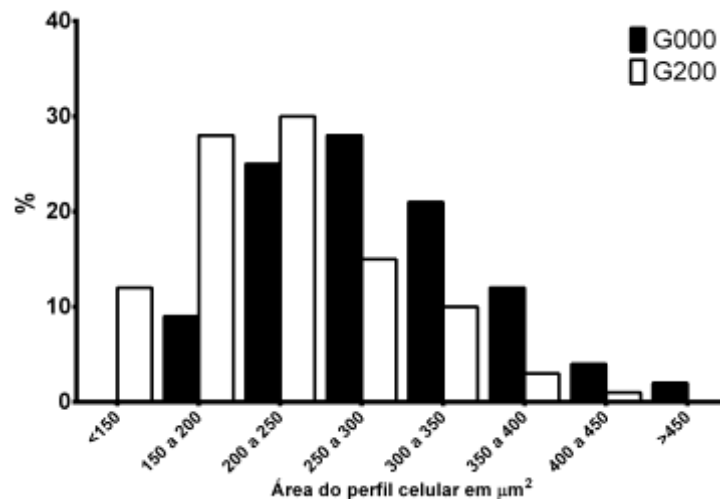
Fonte: O autor.

Figura 12. Histograma de frequência de distribuição em função do tamanho de neurônios mioentéricos do íleo de *Rattus norvegicus* alimentados com dieta sem adição de DON (G000) e com adição de 1,75 mg/kg (G175). As diferenças entre as distribuições são estatisticamente significantes ($p < 0,05$) pelo teste de qui quadrado.



Fonte: O autor.

Figura 13. Histograma de frequência de distribuição em função do tamanho de neurônios mioentéricos do íleo de *Rattus norvegicus* alimentados com dieta sem adição de DON (G000) e com adição de 2,0 mg/kg (G200). As diferenças entre as distribuições são estatisticamente significantes ($p < 0,05$) pelo teste de qui quadrado.



Fonte: O autor.

Observamos através das Figuras 11, 12 e 13, que os animais expostos a doses mais elevadas, representadas pelos grupos G075, G175 e G200, respectivamente 0,75 mg/kg, 1,75 mg/kg e 2,0 mg/kg de DON se comparados ao grupo controle G000, apresentaram diferença entre as distribuições sendo considerada significativa segundo teste de qui quadrado ($p < 0,05$).

Ao analisar o plexo mioentérico observamos variações a respeito do tamanho neuronal entre os cinco grupos experimentais, verificando a existência de neurônios pequenos, médios e grandes. Alguns estudos corroboram que já foram encontrados diferentes tamanhos neuronais em ratos, o que não caracteriza alteração da sua composição química. Deste modo, pode-se perceber uma variação do tamanho neuronal em diferentes segmentos do TGI (SANTER; BAKER, 1988; MOLINARI et al., 1994; MELLO et al., 1997; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996; SANT'ANA et al., 1997).

Deste modo, observando a distribuição de frequência para as doses dos grupos G075, G175 e G200, nota-se nessas condições que a curva tende a deslocar-se para a esquerda revelando que houve um aumento no número de neurônios intermediários entre 150 e 300 μm^2 e redução no número de neurônios grandes entre 350 e 450 μm^2 . Diversos autores, também afirmam ter encontrado a predominância de neurônios intermediários no TGI de ratos, observados para condições normais e também em experimentos sob indução patológica ou adversidades ao organismo (SANTER; BAKER, 1988; ROMANO; MIRANDA-NETO;

CARDOSO, 1996; MELLO et al., 1997; ZANONI et al., 1997; HERNANDES et al., 2000; FREGONESI et al., 2001; SOUZA; FURLAN, 2001; ZANIN et al., 2001).

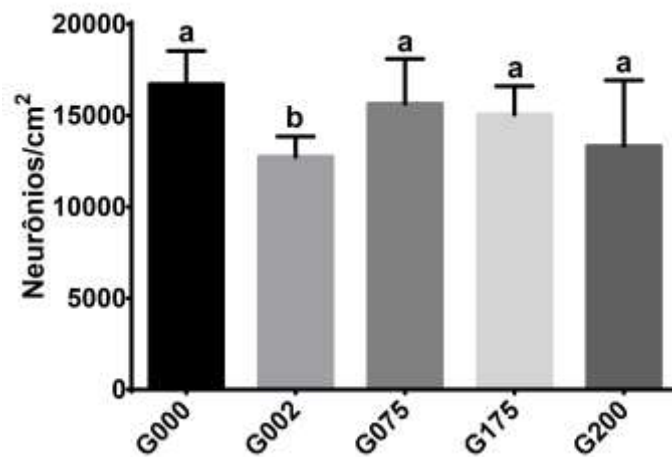
Segundo Marese, Freitas e Natali. (2007) durante o período de 21 a 60 dias de vida do animal, o intestino delgado tende a aumentar em torno de 400% e a partir disso pode sofrer uma redução em até 50% na sua densidade neuronal, o que não caracteriza a morte neuronal, mas sim a redistribuição dos neurônios para suprir uma área maior já que o intestino teve aumento considerável no seu tamanho. Para compensar essa redução os neurônios restantes tendem a ter um aumento da sua área corporal de até 53%, observando-se deste modo à prevalência de neurônios intermediários para garantir a inervação do TGI.

Considerando que os neurônios, não são células capazes de multiplicar-se de modo a afetar o tamanho do perfil do corpo celular, e que o efeito tóxico básico do DON é a inibição da síntese proteica, deve-se levar em conta que os neurônios possuem alta taxa de síntese de proteínas. Diversos trabalhos (NATALI, 1999; HERMES et al., 2008; ALENCAR, 2014), já demonstraram que com redução da disponibilidade de proteínas na dieta, ocorre redução do tamanho do corpo neuronal. Podemos observar a partir dos grupos experimentais, que houve a redução da área do perfil celular, conforme o DON interfere na síntese de proteínas.

4.4 QUANTIFICAÇÃO NEURONAL

Para a quantificação, foram contados os neurônios existentes dentre 50 campos microscópicos por animal, totalizando 300 campos por grupo experimental. Os resultados representam o número de neurônios por centímetro quadrado. Esses 50 campos correspondem a uma área de 9,8175 mm² (Figura 14). A área intestinal média foi de 112,3±7,44 cm² nos animais do grupo controle (G000), 114,5±6,18 cm² no grupo G002, 114,5±6,18 no grupo G075, 113,5±6,02 no grupo G175 e 106,2±4,70 cm² no grupo G200. Não houve diferença estatisticamente significante na área intestinal entre os grupos, por isso não foi necessário utilizar fator de correção para a densidade neuronal.

Figura 14. Densidade de neurônios mioentéricos do íleo de *Rattus norvegicus* expostos a doses de 0,00 mg/kg; 0,2 mg/kg; 0,75 mg/kg; 1,75 mg/kg; 2,0 mg/kg de DON nos grupos G000; G002; G075; G175 e G200 respectivamente. Sendo n=5 e p<0,05 segundo ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores expressos como média±desvio padrão.



Fonte: O autor.

Observamos que, a exposição dos ratos à ração contaminada com DON, causa uma redução na densidade neuronal. O teste de ANOVA mostra que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle (G000) e o grupo experimental G002. Deste modo, verificamos que para a concentração de 0,02 mg/kg houve redução do número de neurônios do plexo mioentérico. Já para as demais doses não houve uma diferença significativa, resultados observados também em estudos experimentais para diabetes, envelhecimento, desnutrição e câncer (SANTER; BAKER, 1988; ROMANO; MIRANDA-NETO; CARDOSO, 1996; MELLO et al., 1997; ZANONI et al., 1997; HERNANDES et al., 2000; FREGONESI et al., 2001; SOUZA; FURLAN, 2001), demonstrando que os neurônios tendem a ser sensíveis quando expostos a condições adversas de saúde (COSTA; BROOKES; HENNING, 2000).

O DON tem como efeito a inibição da síntese de proteínas possuindo a capacidade de ligação com a enzima peptidil transferase. Deste modo, gera um estresse ribotóxico nas células e, de acordo com a dosagem da micotoxina, afeta vias de sinalização importantes que podem comprometer a síntese proteica e até levar a apoptose (BAE et. al, 2010). Esse tipo de inibidor desencadeia uma resposta ao estresse celular gerado ativando as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que formam uma família de proteínas capazes de fazer a transdução de sinal, convertendo sinais extracelulares, como o estresse celular e fatores de crescimento, para ativar uma sequência de reações intracelulares (HUANG; HAN; HUI, 2010; IORDANOV et al., 1997).

As MAPKs são evolutivamente conservadas nos eucariotos e necessárias a processos biológicos essenciais como o controle do ciclo celular, proliferação de células, apoptose, ativação do sistema imune e proteção contra o estresse oxidativo (SEGER; KREBS, 1995). Deste modo, a ativação das MAPKs associada às alterações ribossomais, deixam de fazer a fosforilação necessária para que ocorra a transcrição do RNAm e a tradução das proteínas (PESTKA et al., 2008).

O estresse gerado pelo consumo de baixas doses de DON tende a ativar as MAPKS que fazem parte de um componente em cascata de sinalização que regula a sobrevivência das células ao estresse, o que leva ao aumento do índice de apoptose celular. Já para altas doses de DON tem-se a ativação da via de sinalização da p38 (MAPK) estando relacionada a respostas inflamatórias e levando a inibição da síntese proteica (IORDANOV et al., 1997; LOWELL, 2004; PESTKA et al., 2004; PESTKA, 2010, AOUADI et al., 2006). Os efeitos causados pelo DON tendem a variar de acordo com sua dose, de modo que as intoxicações variam entre aguda e crônica (PESTKA et.al, 2004).

Já para outros animais modelos, como os suínos, observamos que a intoxicação por DON é dose-dependente e provoca o efeito contrário ao observado em ratos. Deste modo, quando ingerido em altas doses o DON age no revestimento do TGI contribuindo para a diminuição da função absorptiva afetando a permeabilidade das células (DILKIN; MALLMAM, 2011; PINTON et al., 2010), levando a alterações na síntese de proteínas e a tendência no aumento do índice de apoptose devido a ativação das vias sinalizadoras MAPKs, diminuindo a eficiência do sistema imunológico (PESKA et al., 2004; PINTON et al., 2010). Já em baixas doses por um período constante, leva os animais à redução alimentar (ROTTER et.al,1994).

A técnica utilizada para a evidenciação neural, mais especificamente, o método de Giemsa modificado por Barbosa (1978), tem como propriedade química marcar com maior evidência os corpos neuronais que se encontram em intensa síntese de proteínas. Já os neurônios que apresentam uma baixa atividade de síntese proteica tendem a permanecer com a coloração pálida, podendo não ser possível sua visualização microscópica. Essa mudança na coloração ocorre devido à interação do azul de metileno presente no corante e os polirribossomos presentes na substância de Nissl dos neurônios. Resultados semelhantes já foram encontrados por Natali e Miranda-Neto (1996) e Leite-Mello, Stabile e Miranda-Neto (1997) que

observaram, para diferentes segmentos intestinais de ratos variações na intensidade de coloração no citoplasma do corpo neuronal no plexo mioentérico após utilização do mesmo método.

Desta forma, os grupos experimentais que contém um maior número de neurônios em síntese proteica apresentam uma maior densidade neuronal. Os resultados permitiram observar que, para a quantificação neuronal que os animais com as doses mais elevadas de DON, sendo os grupos G075, G175 e G200, os neurônios são bem evidenciados pelo corante azul de metileno, reforçando que os mesmos estão em intensa atividade de síntese proteica em relação ao grupo experimental G002, que apresenta uma menor densidade neuronal devido à baixa dose de DON, indicando apoptose dos mesmos.

Logo, os resultados para a quantificação neural apontam, para todos os grupos, que as células neuronais dos animais expostos tendem a sofrer redução em relação ao grupo controle (G000). Ou seja, a partir da técnica de Giemsa e da intensidade de síntese proteica as células neuronais tendem a ser mais evidenciadas ou não. Segundo Junqueira e Carneiro (1999), neurônios que se encontram em intensa síntese de proteínas possuem um retículo endoplasmático rugoso com mais polirribossomos livres, que tendem a ter afinidade por corantes básicos, fazendo com que se tenha uma coloração mais intensa do corpo celular. LLEWELLY'N-SMITH et al. (1993) aborda que a intensidade de coloração do corpo neuronal está diretamente relacionada com alterações na célula e o grau de atividade dos mesmos. Além disso, outro fato a ser considerado é que na maioria dos neurônios mioentéricos, podemos encontrar um nucléolo, às vezes dois, com formato arredondado e normalmente em posição central nos corpos celulares de neurônios de ratos, sendo que o número de nucléolos encontrados é proporcional à intensidade de síntese proteica dos neurônios. (NATALI & MIRANDO-NETO, 1996; ROMANO et al., 1996; LEITE-MELLO; STABILLE; MIRANDA-NETO, 1997; JUNQUEIRA-CARNEIRO, 1999).

Segundo Bogliolo (1981), em situações de agressão celular, onde ocorre algum tipo de interferência no metabolismo da célula como, por exemplo, redução de nutrientes ou estímulos suficientes para que ocorram as sinapses entre os neurônios, os mesmos tendem a apresentar diminuição no seu metabolismo como forma de proteção caracterizando hipotrofia celular. Porém, outros neurônios tem a tendência de inicialmente aumentar seu tamanho, deste modo, aumenta o número

de polirribossomos, RNA e, conseqüentemente, a síntese de proteínas, tentando compensar o dano inicial causado à célula e posteriormente evoluindo para uma possível degeneração (JESSELL, 1991).

Mesmo para o SNC ainda existem poucos estudos que retratam os efeitos diretos do DON sobre esse sistema. Estudos encontrados na literatura demonstraram algumas alterações fisiológicas, como distúrbios nervosos, baseando-se em indícios onde revelam que o consumo de DON atua no cérebro de uma maneira que possa causar danos à neuroquímica cerebral (BONNET et al., 2012). Entretanto, ainda não existem trabalhos publicados sobre os efeitos do DON e a sobrevivência de neurônios mioentéricos. Este estudo representa um trabalho pioneiro em relação dos efeitos do DON sobre a morfologia do SNE, e analisando os possíveis efeitos da micotoxina DON no metabolismo, mais especificamente na síntese proteica nos corpos celulares dos neurônios. Podemos afirmar que neste caso, há uma tendência na diminuição da síntese proteica dos neurônios do plexo mioentérico.

CONCLUSÃO

A exposição ao DON afeta o plexo mioentérico, causando redução no crescimento dos neurônios nos animais alimentados com doses de 0,75, 1,75 e 2,0 mg/kg, e, redução na densidade de neurônios mioentéricos em alta síntese de proteínas na dose de 0,2 mg/kg. Postula-se que esses efeitos se devem às ações de inibição da síntese proteica e efeito pró-apoptótico dessa micotoxina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. A. S; ROVIDA, A. F. S; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, Maringá, v. 21, p. 55–59, 2015.

ALENCAR, C.C.G. **Efeitos da desnutrição proteica na percepção de contraste e acuidade visual em humanos e em ratos**. 2014. 90 f. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia – Neurociências e Comportamento), Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, 2014.

ALI, H. A.; McLELLAND, J. Neuron number in the intestinal myenteric plexus of the domestic fowl (*Gallus gallus*). *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.*, 8:277-283, 1979.

ALTECH, Comércio e Importação Ltda. **Efeitos das micotoxinas sobre a saeúde e a produtividade de animais domésticos específicos**. Disponível em: <<http://www.altech.com.br/i01.htm>.> Acesso em: 5 set./2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de diretoria colegiada – RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011**. Ministério da Saúde – MS, 2011.

AOUADI, M. et al. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. **Biochimie**, v.88, n.9, p. 1091-8, set. 2006.

AUTHORITY, E.F.S. Statement on the risks for public health related to a possible increase of the maximum level of deoxynivalenol for certain semi-processed cereal products. **EFSA Journal**, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), v. 11, p. 50, 2013.

AZCONA-OLIVERA, J. I et al. Induction of cytokine mRNAs in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (Deoxynivalenol): relationship to toxin distribution and protein synthesis inhibition. **Toxicology And Applied Pharmacology**, United States, v. 133, n. 1, p.109-120, 1995. Elsevier BV.

BAE, H. et al. Hematopoietic cell kinase associates with the 40S ribosomal subunit and mediates the ribotoxic stress response to deoxynivalenol in mononuclear phagocytes. **Toxicol. Sci.**, 115, 444–452, 2010.

BARBOSA, A.J.A. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**. v.11, n. 2, pg 95-97, 1978.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, New Orleans, v. 16, n. 3, p.497-516, 2003.

BHAT, R.V et al. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould damage wheat products in Kashmir Valley, India. **Lancet**, Englad, v. 333, n. 8628, p.35-37, 1989. Elsevier BV.

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K.C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical Immunology**. Suíça, v.81, p. 167-206, 2002.

BOGLIOLO, L. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981, 1236p.

BONNET, M.S et al. Advances in Deoxynivalenol Toxicity Mechanisms: The Brain as a Target. **Toxins (Basel)**, Suíça, v. 4, n. 12, p.1120-1138, 2012.

BOUHET, S.; OSWALD, I.P. The intestine as a possible target for fumonisin toxicity. **Molecular Nutrition & Food Research**, Germany, v. 51, n. 8, p. 925-931, 2007.

CALORI-DOMINGUES, M.A et al. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p.181-185, 2007.

CANADY, R.A et al. **Deoxynivalenol: Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food**. Fifty-Sixth Report of The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, International Programme on Chemical Safety. Geneva. Ed. World Health Organization, pp. 420–555, 2001.

CHAROENPORNSOOK, K.; FITZPATRICK, J.L.; SMITH, J.E. The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells In vitro. **Mycopathologia**, v. 143, n. 2, p.105-11, 1998.

CHEN, Z et al. MAP kinases. **Chemical Reviews**, Dallas, Texas, v. 101, n. 8, p. 2449-2476, 2001. American Chemical Society (ACS).

CORRÊA, O. P. **Efeitos da ingestão de ácido 2,4 diclorofenoxiacético sobre os neurônios mioentéricos do jejuno de ratos – Análises quantitativas e morfométrica.** Dissertação mestrado em ciência animal. Universidade paranaense. p. 69, 2010.

COSTA, M.; BROOKES, S.J.H.; HENNING, G.W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut BMJ Journals**, v. 47, n. 90004, p.15-19, 2000.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 127, n. 1-3, p.19-28, fev. 2002. Elsevier BV.

D'ANGELO, L.R.B. **Linhagem de ratos Wistar.** Universidade Federal de São João del-Rei. Disponível em: <<https://ufsj.edu.br/nucal/animais.php>>

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Mycotoxin and mycotoxicosis in swine. Tradução de Gabriela Zaviezo M. A. **LAMIC**. 183p. 2011.

DEVEGOWDA, G.; MURTHY, T.N.K. Mycotoxins: their effects in poultry and some practical solutions. pp. 25–56. DIAZ, Duarte; In: **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham University Press: Nottingham, UK, 2005.

DOMIJAN, A.M. Fumonisin B1: A neurotoxic mycotoxin/fumonisin B1. **Archives Of Industrial Hygiene And Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 531-544, 2012.

DOMIJAN, A. M.; ABRAMOV, A.Y. Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis – implication to mechanism of cell toxicity. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, Netherlands, v. 43, n. 6, p. 897-904, 2011. Elsevier BV.

EHRlich, K. C.; DAIGE, K. W. Protein synthesis by mammalian cells treated with C-3 modified analogs of the 12,13-epoxytricothecenes T-2 and T-2 tetraol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 914-918, 1985.

ERIKSEN, G. S.; PETTERSSON, H.; LINDBERG, J. E. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. **Archives Of Animal Nutrition**, England, v. 57, n. 5, p.335-345, 2003. Informa UK Limited.

FAO/IAEA. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. **Food and Nutrition Division - FAO**, Rome, Italy. p. 2, 2001.

FEINBERG, B.; McLAUGHLIN, C.S. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. BEASLEY, V.R; In: **Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects**. v. 58, n. 2, p. 327-338, 1986. Printed in Great Britain.

FORSYTH, D.M et al. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. **Applied And Environmental Microbiology**, United States, v. 34, n. 5, p. 547–552, 1977.

FREGONESI, C.E.P.T. et al. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 59:50-53, 2001.

FURLAN, M.M.D.P.; SOUZA, J.A. Avaliação morfológica de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos normais e com diabetes experimental. **Arquivos de Ciência da Saúde da Unipar**, Maringá v. 5, n. 2, p 141-147, 2001.

FURNESS, J.B.; COSTA, M. The enteric nervous system. **Department of Anatomy and Cell Biology**. University of Melbourne, Victoria, Australia, p. 29, 1987.

GABELLA, G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. **Journal Of The Autonomic Nervous System**, Netherlands, v. 30, p. 59-66, 1990. Elsevier BV.

GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. International review. **Cytol.**, 59:129-191, 1971.

GABELLA, G.; HALASY, K. On the nerve plexus of the chikengizzard. **Anat. Embriol.**, 177:97-103, 1987.

GERSHON, M.D. **O segundo cérebro**. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, p. 350, 2000.

GIOCOMINI, V.; MENEGAZZO, R. Níveis de vomitoxina (DON) em farelo de trigo na região sul do Brasil. In: **ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., Florianópolis**. Resumos... Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, p. 122, 1988.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001.

HANSEN, M.B. The enteric nervous system I: organization and classification. **Pharmacology And Toxicology**, Dinamarca, v. 92, n. 3, p. 105-113, 2003.

HANSEN, M. B. The enteric Nervous System II: Gastrointestinal. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 92, p. 105-113, 2006.

HERMES, C et al. Efeitos da desnutrição Protéica Severa sobre Aspectos Morfológicos e Quantitativos dos Neurônios Mientéricos do Colón Ascendente de Ratos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia - UNIPAR**, Umuarama, v. 11, n. 1, p. 5-10, 2008.

HERNANDES, L. et al. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 58(4):1035-1039, 2000.

HUANG, P.; HAN, J.; HUI, L. MAPK signaling in inflammation associated cancer development. **Protein and Cell**, v.1, n.3, p. 218-26, mar. 2010.

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene (summary of data reported and evaluation). **Lyon: World Health Organization**, v. 82, 2002.

IORDANOV, M.S. et al. Ribotoxic stress response: activation of the stress activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the α -sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, n.6, p. 3373-81, jun. 1997.

IRWIN, D.A. The anatomy of Auerbach's plexus. **Am. J. Anat.**, 59(1):141-165, 1931.

JESSEL, T. M. **Reactions of neurons to injury**. In: KANDEL, E, R; SCHWARTZ, J. H; JESSELL, T. M. Principles of neural science. Norwalk: Appleton & Langue, 1991.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.19-41.

LAMARDO, L. C. A. **Avaliação de métodos analíticos para determinização de desoxinivalenol e sua ocorrência em amostras de trigo e farinha de trigo**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação da CCD/SES-SP, São Paulo, 2004.

LAZZARI, F.A. 1997. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Ed. do Autor, p. 134, 1997.

LEAMING, D.; CAUNA, N.A. A qualitative and quantitative study of the myenteric plexus of the intestine of the cat. **J. Anat.**, 95(2):160-169, 1961.

LEITE-MELLO, E.V.S.; STABILLE, S.R.; MIRANDA-NETO, M.H. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. **Arg. Neuropsig.**, 55:106-113, 1997.

LLEWELLYN-SMITH, I.J.; COSTA, M.; FURNESS, J.B. Structure of the tertiary component of the myenteric plexus in the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res.**, 272:509-516, 1993.

LOWELL, C. A. Src-family kinases: Rheostats of immune cell signaling. **Molecular Immunology**, v.41, n.6-7, p.631-43, jul. 2004.

MACHADO, L.V et al. **Prevalência de contaminantes do trigo e derivados: Desoxinivalenol**. Universidade Federal de Santa Maria, Bento Gonçalves – RS. 5º Simpósio de Segurança Alimentar Alimentação e Saúde, 2015.

MARESCA, M et al. The Mycotoxin Deoxynivalenol Affects Nutrient Absorption in Human Intestinal Epithelial Cells. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 132, p. 2733-2731, 2002.

MARESE, A.C.M.; FREITAS, P.; NATALI, M.R.M. Alterations of the number and the profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. **Auton. Neurosci. Basic Clin.** 137, 10-18, 2007.

MAROCHI, M.A. **Uma metodologia para triagem, quantificação e confirmação de tricotecenos e zearalenona utilizando cromatografia de camada delgada**. 1988, 133 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência de Alimentos/FEA, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

MELLO, E.V.S.L.; STABILLE, S.R.; MIRANDA-NETO, M.H. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 55(1):106-113, 1997.

MEKHANCHA-DAHEL, C.; LAFARGE-FRAYSSINET, C.; FRAYSSINET, C. Immunosuppressive effects of four trichothecene mycotoxins. **Food Additives And Contaminants**, England, v. 7, n. 1, p. 94-96, 1990. Informa UK Limited.

MILLER, J. David. Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges. **Food Additives & Contaminants: Part A**, England, v. 25, n. 2, p.219-230, 2008. Informa UK Limited.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K.M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. **Toxicology In Vitro**, England, v. 18, n. 1, p.21-28, 2004. Elsevier BV.

MIRANDA-NETO, M.H et al. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 59, n. 1, pg 54-59, 2001.

MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. São Paulo: Fundação Cargill; [Castro]: Fundação ABC, 199 p., 1999.

MOLINARI, S.L. et al. Estudo morfológico do plexo mioentérico do estômago glandular do pato (*Anas sp*). **Rev. Unimar**, 16(2):419-426, 1994.

MORGAVI, D.P.; RILEY, R. T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science And Technology**, [s.l.], v. 137, n. 3-4, p.201-212, out. 2007.

MORRISSEY, R.E. TERATOLOGICAL STUDY OF FISCHER RATS FED DIET CONTAINING ADDED VOMICOTOXIN. **Fd Chem. Toxic.** Vol. 22, n. 6, pp. 453-457, 1894.

NATALI, M.R.M. **Estudo morfoquantitativo e ultra-estrutural do plexo mioentérico do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos submetidos a carência protéica.** 1999. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Anatomia), Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, 1999.

NATALI, M.R.M.; MIRANDA-NETO, M.H. Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of duodenum of rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 54(2):273-279, 1996.

NISTIAR, F et al. **Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment.** J. Environ. Sci. Health Part A 47, p.1224-1233, 2012.

OLIVEIRA, R. L. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de *Piper hispidum*.** 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, 2010.

PERAICA, M et al. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. **Nutrition and Food Safety.** Journal Articles. n. 2, 2000.

PEREIRA, A. P. C. **Efeitos da ingestão do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*).** Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2006.

PEREIRA, L.J. A. **Estratégias para o controlo de Ocratoxina A em alimentos.** 2008. 266 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Universidade do Minho, Braga/Portugal, 2008.

PESTKA, J. J. et al. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 61–73, 2004.

PESTKA, J. J.; AMUZIE, C. J. Tissue distribution and proinflammatory cytokine gene expression following acute oral exposure to deoxynivalenol: Comparison of weanling and adult mice. **Food And Chemical Toxicology**, England, v. 46, n. 8, p.2826-2831, 2008. Elsevier BV.

PESTKA, J.J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives Of Toxicology**, Germany, v. 84, n. 9, p. 663-679, 2010. Springer Nature.

PESTKA, J.J et al. Emetic activity of the trichothecene 15-acetyldeoxynivalenol in swine. **Food And Chemical Toxicology**, England, v. 25, n. 11, p.855-858, 1987. Elsevier BV.

PINTON, P. et al. Deoxynivalenol Impairs Porcine Intestinal Barrier Function and Decreases the Protein Expression of Claudin-4 through a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Mechanism. **The Journal of Nutrition**, v. 140, p. 1956–1962, 2010.

PRADO G. Contaminação de alimentos por micotoxinas no Brasil e no mundo. **GERAIS: Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, Minas Gerais, v. 2, p. 11-24, 2014.

PRELUSKY, D.B et al. Pharmacokinetic fate of ¹⁴C-labeled deoxynivalenol in swine. **Fundamental And Applied Toxicology**, United States, v. 10, n. 2, p.276-286, 1988. Elsevier BV.

RADOVÁ, Z; HOLADOVÁ, K; HAJLLOVÁ, J. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 829, n. 1-2, p. 259-267, 1998. Elsevier BV.

ROMANO, C.B.; MIRANDA-NETO, M.H.; CARDOSO, R.S. Pre-liminary investigation about the effects of streptozotocin induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. **Rev. Chil, Anat.**, 14(2):139- 145, 1996.

ROTTER, B. A et al. Influence of low level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 23, p. 117-124, 1994.

SANT'ANA, D.M.G. et al. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon rats subjected to proteic desnutrition. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 55(4):687-695, 1997.

SANTER, R.M.; BAKER, D.M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **Journal Of The Autonomic Nervous System**, Netherlands, v. 25, n. 1, p. 59-67, 1988. Elsevier BV.

SANTOS, J. S et al. Zearalenona e desoxinivalenol em trigo brasileiro – cenário sobre necessidade de monitoramento analítico. **Revista Biosaúde**, Londrina, v. 12, n. 1 / 2, 2010.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 01-12, 2000.

SEGER, R.; KREBS, E. G. "The MAPK signaling cascade." **FASEB J** 9(9): 726-735, 1995.

SNYDER, A.P. Qualitative, Quantitative and Technological Aspects of the Trichothecene Mycotoxins. **Journal Of Food Protection**, Maryland, v. 49, n. 7, p. 544-569, 1986. International Association for Food Protection.

SOBROVA, P et al. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, Eslováquia, v. 3, n. 3, p.94-99, 2010.

SOUSA, F.C.; MIRANDA-NETO, M.H. Morphometric and quantitative study of the myenteric neurons of the stomach of malnourished aging rats. **Nutritional Neuroscience**, England, v. 12, n. 4, p.167-174, 2009. Informa UK Limited.

SOUSA, F.C de. **FUMONISINAS E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE RATOS WISTAR**. 2013. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

SOUZA, J.A.; FURLAN, M.M.D.P. Avaliação morfológica de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos normais e com diabetes experimental. **Arq. Ciênc. Saúde da Unipar**, 5(2):141-147, 2001.

STREIT, E et al. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, England, v. 93, n. 12, p. 2892-2899, 26 jun. 2013.

THOMAS, G.M.; HUGANIR, R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, England, v. 5, n. 3, p. 173-183, 2004. Springer Nature.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8ª Ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

UENO, Y. The toxicology of mycotoxins. **Critical Reviews in Toxicology**, England, v.14, n. 2, p.99- 132, 1985.

UENO, Y. Trichothecene mycotoxins. **Mycologia, chemistry and toxicology**, New York: Ed. Draper, v. 3, p. 301-353, 1980.

UENO, Y. **Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects**. Tokyo: Ed. Kodansha-Elsevier, p. 313, 1983.

VIEIRA, S. M. **Química dos cereais**. reed. Fortaleza: SENAI – CE/CERTREM, 2006.

VILLAR, D.; CARSON, D.L. Trichothecene mycotoxins. PLUMLEE, K. In: **Clinical Veterinary Toxicology**, St. Louis, MO, USA: Ed. K.H, pp. 270–275, 2004.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, Oxford University, England, v. 31, n. 1, p. 71-82, 2009.

ZANONI, J.N. et al. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin diabetics rats. **Arq. Neuropsiquiatr**, 55:696-702, 1997.

ZANIN, S.T.M. et al. Densidade dos neuronios mioentéricos nadh-diaforase positivos do jejuno de ratos (*Rattus norvegicus*). **Arq. Ciênc. Saúde da Unipar**, 5(1):3-7, 2001.

ANEXO



Ministério da Educação
 UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
 Câmpus Dois Vizinhos
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

Título:	Efeitos do desoxinivalenol sobre a parede e plexo mioentérico do intestino delgado de ratos Wistar
Área Temática:	Morfologia
Pesquisador / Professor:	Fernando Carlos de Souza
Instituição:	Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos - UTFPR- DV
Versão:	002

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2014-014
Título: Efeitos do desoxinivalenol sobre a parede e plexo mioentérico do intestino delgado de ratos Wistar	
Pesquisador/Professor: Fernando Carlos de Souza	
Área temática: Morfologia	
Instituição: Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Dois Vizinhos - UTFPR- DV	
Financiamento: CNPq	
Apresentação do Projeto: O presente projeto trata-se de uma pesquisa científica para avaliar os efeitos do uso de desoxinivalenol (DON) na ração sobre os neurônios e células gliais do plexo mioentérico. Para isto serão utilizados 50 ratos Wistar com 21 dias de idade alimentados com diferentes níveis de DON (0, 0,2; 0,75; 1,75 e 2,0 mg/kg) por 42 dias, sendo cinco tratamentos com 10 animais cada. Nos animais serão analisados parâmetros bioquímicos e hematológicos, aproveitamento da dieta, digestibilidade das rações, desempenho de crescimento e composição corporal. Para a coleta das amostras será realizado o sacrifício dos animais por overdose de anestésico geral tiopental sódico (120 mg/kg de peso corporal).	



<p>Objetivo:</p> <p>Avaliar os efeitos da dieta com níveis crescentes de DON sobre o desempenho e parâmetros do sistema nervoso entérico de ratos.</p>
<p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p> <p>A pesquisa possui relevância científica.</p> <p>Com relação aos riscos o grau de invasividade se enquadra no tipo I (GI I) uma vez que todos os procedimentos/coleta de amostras serão realizados após a morte dos animais que receberão uma sobre dosagem do anestésico tiopental sódico via intravenosa.</p>
<p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula Prática:</p> <p>A pesquisa é importante pois aborda um assunto de interesse tanto à saúde animal quanto à saúde pública, e também por haver poucos trabalhos na área.</p> <p>Além disso, o pesquisador e as pessoas envolvidas na pesquisa deverão ter atenção especial ao manipular o DON, principalmente com relação aos materiais que entrarão em contato com a micotoxina.</p>
<p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</p> <p>A documentação apresentada junto ao comitê de ética é composta de cinco arquivos em pdf: 1 - <i>requerimento ao CEUA/UTFPR</i>, 2 - <i>formulário unificado para solicitação de autorização do uso de animais em ensino ou pesquisa em modelo do CEUA/UTFPR</i>, 3 - <i>Projeto de Pesquisa Científica ou Desenvolvimento Tecnológico em modelo da UTFPR/CEUA</i>, 4 - <i>Declaração de não início das atividades</i> e 5 - <i>Registro de projetos de pesquisa na DIRPPG - DV</i>.</p>
<p>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</p> <p>Mencionar o número de animais que serão sacrificados. Mencionar as medidas a serem tomadas caso algum animal venha a ficar debilitado/em sofrimento em função da dieta contaminada com DON.</p>
<p>Situação do Parecer:</p> <p>APROVADO, após ter apresentado as adequações necessárias.</p>

Dois Vizinhos, 23 de fevereiro de 2015.

Assinado por:

Patricia Franchi de Freitas

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná